

РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ И НЕРВНЫХ КЛЕТКАХ КОРЫ БОЛЬШОГО МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ИШЕМИИ НА ФОНЕ ИНГИБИТОРА NO-СИНТАЗЫ

Бочарова В.Н., Савчина Е.Н.

Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

В настоящее время развитие ишемии мозга и последующее возникновение инсульта связывают с нарушением мозгового кровообращения. В патогенезе ишемических повреждений большого мозга особая роль принадлежит оксиду азота (NO). NO в мозге локализуется в эндотелиоцитах кровеносных сосудов, микроглии, астроцитах, а так же в нервных клетках.

Повышенная продукция NO при участии конститутивных и индуцибельных NO-синтаз при ишемии мозга, связанная с гиперактивацией NMDA подтипа глутаматных рецепторов, может иметь отрицательные последствия за счет повышенного образования свободнорадикальных продуктов типа пероксинитрита. В то же время NO, оказывая вазодилататорный эффект на сосуды головного мозга и вызывая блокаду NMDA-рецепторов, может иметь так же и положительное влияние на течение ишемии [1].

Использование доноров NO и ингибиторов NO-синтазы при моделировании ишемии головного мозга дало противоречивые результаты. Высказано предположение, что NO может оказывать благоприятное действие в первый период возникновения ишемии, но давать нейротоксический эффект в более поздние сроки [1]. В гистохимических исследованиях уровень секреции NO, как правило, определяется по активности NADPH-диафоразы (NADPH-d), кофермента NO-синтазы.

По данным ряда авторов, метод определения NADPH-d является топахимическим маркером степени активности конститутивных нейрональной и эндотелиальной NO-синтаз [2]. Задача настоящего исследования заключалась в том, чтобы с помощью гистохимического и морфологического методов изучить реактивные изменения, а также активности NADPH-d в эндотелиальных и нервных клетках теменной доли коры головного мозга при моделировании

ишемии на фоне ингибитора NO-синтазы.

Материал и методы исследования. Эксперименты проведены на 35-ти крысах-самцах массой 250-300г с применением нимбутал-уретанового (20 и 400 мг/кг внутривентрально) наркоза. Церебральную ишемию (3 ч) вызывали двусторонним пережатием сонных артерий, что является удобной моделью, если принять во внимание, что сравнительно слабое развитие у крыс артериального круга головного мозга не создает достаточного кровоснабжения за счет позвоночных артерий [3].

Для выявления эндотелиальной и нейрональной NO-синтазы в коре головного мозга использовали методику определения активности фермента NADPH-d [4]. Материалы фиксировали погружением в 4% раствор параформальдегида на 0,1М фосфатном буфере (pH 7,2) при температуре 4 °C в течение 1 сут. Затем кусочки мозга промывали в фосфатном буфере в течение 2 ч, погружали на 30 минут в 10% раствор сахарозы и в 25% растворе сахарозы оставляли на ночь.

Срезы толщиной 15 мкм окрашивали в течение 1ч в термостате при 37 °C в инкубационной среде, приготовленной на 0,1М фосфатном буфере (pH 7,2) и содержащей 2 мг/мл β -NADPH (Sigma) и 0,3% Тритона X-100 (Serva). В качестве контроля использовали окрашивающий раствор без добавления β -NADPH.

Цитометрический анализ окрашенных препаратов проводили на микроскопе-фотометре MPV-2 (фирмы Leitz). Активность NADPH-d оценивали по оптической плотности окраски среза, обусловленной содержанием конечного продукта реакции – формазана.

Морфологические изменения в нейронах коры головного мозга оценивали на срезах, окрашенных кризоловым фиолетовым по Нисслю (1996).

Оптическую плотность в эндотелиоцитах кровеносных сосудов и нейронах коры головного мозга измеряли с помощью цифровой камеры Leica 300F и предназначенной для этой цели компьютерной программы. Результаты опытов статистически обрабатывались с применением критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа ANOVA.

Результаты и их обсуждение. Результаты цитохимического исследования срезов теменной доли коры головного мозга показали, что во всех ее слоях

присутствуют нейроны с высокой активностью NADPH-d. Они разнообразны по размеру, форме и количеству отходящих от тел отростков.

Среди них обнаруживались уни-, би- и мультиполярные с темно-фиолетовой окраской их цитоплазмы. Окраска распространялась на дендриты и аксон.

В результате нейроны с высокой активностью NADPH-d и их отростки приобретали сходство, типичное для интернейронов, импрегнированных азотнокислым серебром по методу Гольджи.

Предполагается, что они являются тормозными интернейронами, обеспечивающими локальные внутрикорковые связи, и передача нервных импульсов в них осуществляется с помощью ГАМК [1, 5]. Такого рода нейроны располагались чаще всего на значительном расстоянии друг от друга, но встречались и группы из 2-3 нейронов. Для большинства NADPH-d-позитивных нейронов коры весьма характерна их сопричастность к кровеносным сосудам. Их отростки не только сопровождали сосуды, контактируя с ними, но и окружали своими терминалями. Отмечалось также тесное прилегание самих нейронов к стенке сосудов.

Полагают, что эти нейроны выступают в качестве нейросекреторных клеток, принимающих участие в регуляции сосудистого тонуса [5]. В гигантских пирамидальных нейронах активность NADPH-d не обнаружена. Активность NADPH-d выявлялась и в эндотелиальных клетках мелких и крупных кровеносных сосудов. Однако интенсивность окраски в них была ниже, чем в нейронах.

При 3-х ч ишемии головного мозга, вызываемой двусторонней окклюзией сонных артерий, активность NADPH-d в нейронах возрастала на $63,7 \pm 5,9\%$, в эндотелиоцитах – на $37,3 \pm 4,1\%$ ($p < 0,05$). Используя в наших исследованиях ингибитор NO-синтазы L-NAME (25 мг/кг), введенный внутривенно за 30 мин до создания церебральной ишемии (3 ч), активность NADPH-d в нейронах и эндотелиоцитах коры снижалась на $23,8 \pm 1\%$ и $14,7 \pm 1,8\%$ ($p < 0,05$) соответственно. При светооптическом исследовании срезов теменной доли коры головного мозга, окрашенных по методу Ниссля, у животных определялись нейроны в различном морфофункциональном состоянии.

При 3-х ч ишемии в части нейронов коры были отмечены участки растворения хромотофильной субстанции. Выявлялись нейроны, тела которых выглядели набухшими, ядро сдвинуто к одному из полюсов, а базофильная субстанция уменьшена.

После ишемии на фоне ингибитора NO количество нейронов, находившихся в состоянии острого набухания увеличивалось. Отмечалась отечность эндотелия сосудов, а в единичных случаях нарушение целостности их стенок.

Заключение. Таким образом, при ишемии головного мозга на фоне торможения синтеза NO в части нейронов и эндотелиоцитов сосудов теменной области коры выявлены реактивные изменения, свидетельствующие об их функциональном напряжении.

Данные изменения могут свидетельствовать о реализации репаративных процессов после ишемического повреждения.

Литература:

1. Раевский К.С. Оксид азота – новый физиологический мессенджер: возможная роль при патологии центральной нервной системы // Бюл. Экспер. Биол. – 1997. – Т. 123, №5. – С. 484-490.
2. Охотин В.Е., Шуклин А.В. Значение нейрональной, эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы в гистофизиологии сердечной мышцы // Морфология. – 2006. – Т. 129, №1. – С. 7-15.
3. Боголепов Н.Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга. М., изд. 1-го Московск. мед. ин-та, 1976.
4. Vincent S. R., Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain // Neuroscience. – 1992. – Vol. 46. – P. 755-784.
5. Охотин В.Е., Куприянов В.В. Нейровасальные отношения в новой коре головного мозга человека // Морфология. – 2006. – Т. 110, №4. – С. 17-21.